

AROMA, FLAVOR AND CHEMICAL COMPOSITION  
OF CIGARETTE TOBACCO AND SMOKE

The aroma and flavor of tobacco and its smoke are of great interest to chemists at present. To a large extent, this interest has been responsible for a rapid expansion of knowledge of the chemical composition of tobacco. At present, more than 685 chemical compounds are known to occur in leaf and smoke (1, 2). Although many of these components are odorless and tasteless, most of them can be considered as potential sources of organoleptic substances in smoke through pyrolytic degradation or possible synergistic effects. Also, there is no assurance that compounds which have an odor really contribute to leaf aroma or smoke flavor. In fact, it should be emphasized that people respond differently to a given aroma and that many aromas are dynamic, e.g. the grossly different odors of so-called « fresh » and « stale » cigarette smoke.

Among the many problems involving tobacco aroma are those related to finding chemical differences among the so-called « types » and « grades » of tobacco. The major types of tobacco used in the U.S.A. are bright, burley, Maryland, and Turkish, which are blended into cigarettes having bright tobacco as the major component. These types differ greatly in the physical and chemical properties of leaf and smoke. Each type comes in a variety of grades, for which there are many systems of classification. The strength of the leaf aroma is one of the many characteristics frequently evaluated in these systems. Although group determinations such as  $\alpha$ -amino nitrogen or total volatile bases give some indication of leaf (3, 4) or smoke (5) quality and show differences among types and grades, detailed information on the chemical constituents which may contribute to aroma or flavor has been lacking until recently.

\* Eastern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S.D.A., 600 East Mermaid Lane, Philadelphia, Pennsylvania, 19118, U.S.A.

\*\* Presented at the 145th National Meeting, American Chemical Society, New York, September 13, 1963. Author's summary published in the Inf. Bull. Coresta 1963-3, abstr. 7482.

L'arôme et la saveur du tabac et de la fumée sont actuellement l'objet d'un grand intérêt pour les chimistes. Dans une large mesure cet intérêt a amené une expansion rapide des connaissances concernant la composition chimique du tabac. A l'heure actuelle on sait que plus de 685 composés se trouvent dans la feuille et la fumée (1,2). Bien qu'un grand nombre de composés soient inodores et insipides, la plupart d'entre eux peuvent être considérés comme des sources potentielles de substances organoleptiques dans la fumée par dégradation pyrolytique ou effets synergiques possibles. De même il n'est pas certain que des composés qui ont une odeur contribuent réellement à l'arôme de la feuille ou à la saveur de la fumée. En fait il y a lieu de souligner que les individus réagissent d'une manière différente à un arôme donné, et qu'un grand nombre d'arômes sont dynamiques, ainsi par exemple, les odeurs totalement différentes de la fumée suivant que la cigarette est « fraîche » ou « éventée ».

Parmi les nombreux problèmes que comporte l'arôme du tabac figurent ceux qui ont trait à la recherche des différences chimiques parmi ce qu'on a appelé les « types » et les « grades » du tabac. Les types principaux de tabac employés aux U.S. sont le flue-cured, le burley, le maryland et l'orient, qui sont mélangés en des cigarettes dont le tabac flue-cured est le composant principal. Ces types ont de grandes différences entre eux par les propriétés physiques et chimiques de la feuille et de la fumée. Chaque type se présente en une variété de « grades », pour lesquels existent de nombreux systèmes de classification. La force de l'arôme de la feuille est l'une des nombreuses caractéristiques souvent retenues en ces systèmes. Bien que les déterminations des groupes, tels que les bases  $\alpha$ -amino-azotées ou entièrement volatiles, fournissent quelques indications sur la qualité de la feuille (3,4) ou de la fumée (5) et montrent des différences parmi les types et les grades, on a manqué jusqu'à une époque récente d'une information détaillée sur les constituants chimiques qui peuvent contribuer à l'arôme ou à la saveur.

\*\* Présenté à la 145<sup>e</sup> réunion nationale de l'American Chemical Society, New York, 13 septembre 1963. Résumé d'auteur paru dans le Bull. Inf. Coresta 1963-3, anal. 7482.

In the case of leaf, the most extensive study on compounds possibly contributing to aroma has been published by ONISHI and colleagues (6) in a series of sixteen papers. These workers isolated and identified more than forty acidic, basic, and neutral compounds by methods not involving gas chromatography. Except for a superficial comparison of bright and burley, differences among tobacco types and grades were not investigated.

Other published studies on leaf have been limited to a specific group of compounds, e.g. carbonyls in the neutral fraction. WEYBREW and co-workers (7,8) have investigated the volatile carbonyls of many tobacco types and grades and found differences. Some trend toward a relationship between quality and composition was found, but a conclusive correlation was not obtained. In general, good quality leaf had higher levels of acetone and methyl ethyl ketone than low quality; the reverse was true with isobutyraldehyde and isovaleraldehyde. Turkish tobacco had a carbonyl content not greatly different than bright or burley. Grades of bright tobacco designated as « Fully Aromatic » were found to have lower levels of total, volatile carbonyls than « Less Aromatic » grades. Surprisingly, the carbonyl content was found to vary inversely with the moisture levels in the leaf, which was interpreted as evidence for an *in situ* precursor pool of carbonyls.

Recently, our laboratory has undertaken an extensive study of the entire steam-volatile neutral fraction in leaf and smoke by gas chromatographic methods. Our initial work concerned the neutral substances in leaf (9). In general, the bulk of the volatile neutrals consisted of substances which eluted from polar columns at temperatures greater than 175°, but many trace components were seen. The following tentative identifications were made for 7 of the approximately 14 peaks which were of interest : furfural, *n*-capraldehyde, 5-methylfurfural, furfuryl alcohol, *m*-tolualdehyde, benzyl acetate, and the acyclic diterpene hydrocarbon, neophytadiene.

Most of the furan derivatives were probably artifacts from carbohydrate degradation during steam distillation, although small amounts of some of these components are present in leaves not extensively heated.

Compared to Turkish leaves the steam-volatile neutral fractions of bright, burley, and Maryland leaves gave chromatograms which were qualitatively similar but quan-

En ce qui concerne la feuille, l'étude la plus complète sur les composés pouvant contribuer à l'arôme a été publiée par ONISHI et ses collègues (6) dans une série de seize communications. Ces chercheurs ont isolé et identifié plus de 40 composés acides, basiques et neutres par des méthodes ne comportant pas la chromatographie en phase gazeuse. Sauf pour une comparaison superficielle entre le flue-cured et le burley, on n'a pas étudié les différences entre les types et grades de tabac.

D'autres études publiées sur la feuille ont été limitées à un groupe spécifique de composés, par exemple les carbonyles dans la fraction neutre. WEYBREW et ses collaborateurs (7,8) ont étudié les carbonyles volatils de nombreux types et grades de tabac et ont trouvé des différences entre eux. On a trouvé quelque tendance à une parenté entre qualité et composition, mais on n'est pas arrivé à une corrélation concluante. En général, la feuille de bonne qualité a un niveau d'acétones et de méthyl-éthyl-cétones plus élevé que la basse qualité; le contraire a été constaté pour les aldéhydes isobutyrique et isovalérique. Le tabac d'Orient a une teneur en carbonyles qui n'est guère différente de celle du flue-cured ou du burley. Des grades de tabac flue-cured désignés comme « pleinement aromatiques » sont apparus comme ayant des niveaux de carbonyles totaux volatils plus bas que le grade « faiblement aromatique ». Chose surprenante, on a constaté que la teneur en carbonyles varie en raison inverse du degré d'humidité de la feuille, ce qui a été interprété comme étant l'évidence de la préexistence de carbonyles *in situ*.

Notre laboratoire a entrepris récemment une étude complète de la fraction entière des neutres entraînés à la vapeur par la méthode de la chromatographie en phase gazeuse. Nos travaux de début ont eu pour objet les substances neutres de la feuille (9). D'une façon générale, l'ensemble des neutres volatils a consisté en des substances se dégageant des colonnes polaires à des températures de plus de 175°, mais on a trouvé un grand nombre de composants à l'état de traces. On a procédé à des essais d'identification de 7 des 14 sommets, approximativement, qui présentent de l'intérêt : furfurol, *n*-capraldéhyde, 5-méthylfurfurol, alcool furfurylique, *m*-tolualdéhyde, acétate de benzyle et l'hydrocarbure diterpène acyclique, néophytadiène.

La plupart des dérivés du furane étaient probablement des produits de la dégradation des hydrates de carbone au cours de la distillation à la vapeur, bien que de petites quantités de quelques-uns de ces constituants se trouvent dans des feuilles qui n'ont pas été chauffées très fortement.

Comparées aux feuilles de tabac d'Orient les fractions neutres, volatiles à la vapeur, de feuilles de flue-cured, de burley et de maryland ont donné des chromatogrammes

titatively different. Determination of these quantitative differences presented problems, especially with respect to unidentified peaks, for which data on relative sensitivities in the detection system and on ranges of linear response could not be obtained. An empirical, comparative system was devised in which peak areas were measured and then corrected for volume of solution injected and weight of moisture-free tobacco steam distilled. Representative data for the major peaks in the neutral fraction are shown in Table 1 and illustrate the ranges of differences found in types and grades using such a method. The three samples designated « Aromatic » and the two « Aroma-Deficient » were bright tobacco. The values are given as ratios of corrected peak areas with « Aromatic A » arbitrarily designated as the reference. Fourteen peaks were evaluated in this manner and the summation of the areas of the 14 peaks on the chromatogram is given here in the first column on a relative basis. The three aromatic samples gave higher values for all 14 peaks than the aroma-deficient, although the difference between Aromatic B and Aroma-Deficient A was probably insignificant. Among the types, Turkish (Samsun), which is recognized as a highly aromatic tobacco, gave the highest values. Burley and Maryland were quite similar to each other and higher than most of the bright samples. Among the grades of bright, only furfuryl alcohol was larger in all aromatic grades compared to aroma-deficient.

Another group of compounds possibly contributing to leaf aroma are the volatile acids. ONISHI and others (6) have presented some information on these acids, but no comprehensive survey has been forthcoming. Recently, we have studied these components in leaf and smoke (10, 11). In leaf, the following components were found in the volatile acid fraction: formic, acetic, propionic, isobutyric, n-butyric, isovaleric, n-valeric,  $\beta$ -methylvaleric, isocaproic, n-caproic, n-heptylic, n-caprylic, and n-pelargonic acids and four unidentified peaks. Table 1 shows major quantitative differences in the  $C_2-C_6$  acids of leaf types and grades; formic acid is not included here due to difficulties of chromatographic detection and separation (11). Among the types, most aromatic grades of bright and Turkish (Samsun) had about the same level of total  $C_2-C_6$  acids, but burley and Maryland were significantly lower. Turkish differed from bright in having

qualitativement identiques mais quantitativement différents. La détermination de ces différences quantitatives a posé des problèmes, particulièrement en ce qui concerne les pics non identifiés, pour lesquels on n'a pu obtenir de données sur les sensibilités relatives dans le système de détection ainsi que sur les intervalles dans lesquels la réponse est linéaire. Un système empirique comparatif a été conçu, dans lequel les surfaces des pics ont été mesurées puis corrigées pour tenir compte du volume de solution injecté et de la correction pour humidité du poids de tabac soumis à la distillation à la vapeur. Des chiffres représentatifs pour les principaux pics dans la fraction neutre sont donnés au tableau I et illustrent la gamme des différences existant dans les types et les grades pour lesquels cette méthode est employée. Les trois échantillons désignés « aromatiques » et les deux « sans-arôme » étaient des tabacs flue-cured. Les valeurs données sont rapportées aux surfaces corrigées des pics, l'échantillon « aromatique A » étant arbitrairement choisi comme référence. Quatorze pics ont été évalués de cette manière, et la somme des surfaces des quatorze pics sur le chromatogramme est donnée ici dans la première colonne sur une base relative. Les trois échantillons aromatiques ont donné des valeurs plus élevées pour les quatorze pics que les « sans-arôme », bien que la différence entre « aromatique B » et « sans-arôme A » soit probablement insignifiante. Parmi les types, l'Orient (Samsun), qui est considéré comme un tabac hautement aromatique, a donné les valeurs les plus élevées. Le burley et le maryland ont été tout à fait semblables et ont donné une valeur plus élevée que la plupart des échantillons flue-cured. Dans les types flue-cured, seul l'alcool furfurylique a été trouvé en plus grande quantité dans tous les grades aromatiques comparés aux sans-arôme.

Un autre groupe de composés, qui contribuent peut-être à l'arôme de la feuille sont les acides volatils. ONISHI et d'autres (6) ont présenté quelque information sur ces acides, mais aucune étude complète n'a été faite. Récemment nous avons étudié ces composés dans la feuille et la fumée (10, 11). Dans la feuille, les composés suivants ont été trouvés dans la fraction des acides volatils: acides formique, acétique, propionique, isobutyrique, n-butyrique, isovalérique, n-valérique,  $\beta$ -méthylvalérique, isocaproïque, n-caproïque, n-heptylique, n-caprylique et n-pélagonique, et quatre pics non identifiés. Le tableau I montre des différences quantitatives majeures dans les acides  $C_2-C_6$  des types et grades de feuilles; l'acide formique n'est pas compris ici en raison de difficultés de détection et de séparation chromatographique (11). Parmi les types, la plupart des grades aromatiques de flue-cured et d'Orient (Samsun) avaient à peu près la

higher proportions of branched-chain to normal  $C_5$  and  $C_6$  isomers (Table 1). The proportion of  $\beta$ -methylvaleric acid in the total volatile acid fraction was very high in Turkish. Among the grades, the two aroma-deficient samples contained less total acid in the  $C_2-C_6$  range than the three aromatic samples.

Prior to these studies on the volatile acids and neutrals, a panel test on the relative aromaticities of these five grades of bright tobacco was made by the commercial supplier. Subsequent to the chemical evaluations, the panel test results were made available to us for comparison. The over-all findings are shown in Table 2. In the panel tests fifteen observers made two independent comparisons and the relative aromaticities found are given here. A value of « one » represents the greatest aromaticity and « five » indicates the least. The same code was used for the total neutrals and acids with one exception : when two samples gave essentially the same level, they were assigned two numbers indicating a « tie », e.g. Aromatic B and Aroma-Deficient A with a tied rating of 3.4 for neutrals. A correlation between the relative aromaticities and levels of total  $C_2-C_6$  acids is apparent. Some slight deviation was found in the comparison between neutrals and aromaticity, but a high degree of correlation is still apparent.

It should be mentioned that in our recent publication (9) on the steam-volatile neutrals, we stated that a conclusive correlation between leaf aromaticity and total neutrals was not obtained. This conclusion was formulated before the panel test results were obtained and was based on the assumption that all aromatic (or aroma-deficient) samples were equally aromatic (or deficient). Recently the results of the panel test were obtained and we have now been able to revise our original conclusions in a more favorable way.

Similar studies have been performed on the smoke of cigarette tobaccos. Physically, cigarette smoke is an aerosol composed of a continuous phase of gases and vapors and a discontinuous phase, or particulate phase, of solids and liquids. HOBBS and co-workers (12, 13) have provided an excellent, general picture of cigarette smoke composition and shown that about 90% of the smoke are gases or vapors and 10% is particulate matter. The bulk, i.e. more than 90%, of the continuous phase consists of substances not condensable at  $-190^\circ C$  and

même teneur en acides totaux  $C_2-C_6$ , mais le burley et le maryland en avaient une netteté plus basse. L'Orient différait du flue-cured par une proportion plus élevée d'isomères normaux en  $C_5$  et  $C_6$  à chaîne ramifiée, (tableau I). La proportion d'acide  $\beta$ -méthylvalérique dans la fraction acide totale volatile était très élevée dans l'Orient. Parmi les grades, les deux échantillons « sans-arôme » contenaient moins d'acide total dans la série  $C_2-C_6$  que les trois échantillons aromatiques.

Antérieurement à ces études des acides volatils et des fractions neutres, une épreuve sur les aromaticités relatives de ces cinq grades de tabac flue-cured, par un jury de dégustateurs, avait été organisée par le fournisseur commercial. Après les évaluations chimiques nous avons pu voir, pour comparaison, le résultat de ces épreuves. L'ensemble des observations figure au tableau 2. Dans l'épreuve de dégustation quinze observateurs ont fait deux comparaisons indépendantes, et l'on donne ici les aromaticités relatives qui ont été constatées. La cote 1 représente l'aromaticité la plus forte et 5 la plus faible. Le même code a été employé pour les neutres et les acides totaux, avec une exception : lorsque deux échantillons ont donné essentiellement le même niveau, on leur a assigné deux nombres jumelés, ainsi, par exemple : pour aromatique B et pour sans-arôme A la cote des neutres est 3.4. Une corrélation entre les aromaticités et les niveaux relatifs des acides totaux  $C_2-C_6$  est apparente. Une légère déviation a été constatée dans la comparaison entre neutres et aromaticités, mais un degré élevé de corrélation est cependant apparent.

On doit mentionner que dans notre travail récent sur les neutres entraînaibles à la vapeur nous avons constaté qu'on n'avait pas obtenu de corrélation concluante entre l'aromaticité de la feuille et les neutres totaux. Cette conclusion a été formulée avant que les résultats de l'épreuve de dégustation aient été connus et elle était basée sur la supposition que tous les échantillons aromatiques (ou sans-arôme) étaient aromatiques (ou sans-arôme) au même degré. Mais nous avons eu connaissance des résultats de l'épreuve et nous avons été alors en mesure de réviser nos conclusions premières dans un sens plus favorable.

Des études semblables ont été faites sur la fumée de tabacs à cigarettes. Au point de vue physique, la fumée de cigarette est un aérosol composé d'une phase continue de gaz et vapeurs et d'une phase discontinue ou phase particulaire de solides et liquides. HOBBS et ses collaborateurs ont donné une excellente description générale de la composition de la fumée de cigarette et montré qu'environ 90% de la fumée sont des gaz ou des vapeurs et 10% des substances particulières. La majeure partie, soit plus de 90% de la phase continue,

TABLE 1

Total, steam-volatile neutrals and acids and differences in certain isomeric distributions of acids for tobacco types and grades.

Fractions neutres et acides totales, entraînables à la vapeur et différences dans certaines répartitions des isomères des acides dans des types et grades de tabac.

Tobacco	Total Neutrals <sup>a</sup>	Total Acids <sup>a</sup>	Isomeric Distributions <sup>b</sup>	
			$\frac{i-C_5}{n-C_5}$	$\frac{BMV}{n-C_6}$
Aromatic A . . . .	1.0	1.0	1.0	1.0
Aromatic B . . . .	.57	.84		
Aromatic C . . . .	.62	.95		
Aroma-Deficient A . . . .	.57	.77		
Aroma-Deficient B . . . .	.24	.71		
Burley . . . . .	1.1	.13	2.0	.43
Maryland . . . . .	1.1	.22	2.6	.67
Turkish . . . . .	1.6	.97	2.3	3.9

<sup>a</sup> Determined by gas chromatography. Total acids include C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub> acids. Values are relative amounts based on Aromatic A as a reference. All aromatic or aroma-deficient samples were bright tobaccos. The Turkish sample was Samsun.

<sup>b</sup>  $\frac{i-C_5}{n-C_5} = \frac{\text{Relative amount of isovaleric acid compared to Aromatic A}}{\text{Relative amount of n-valeric acid compared to Aromatic A}}$

BMV =  $\beta$ -methylvaleric acid.

n-C<sub>6</sub> = n-caproic acid

<sup>a</sup> Déterminé par chromatographie gazeuse. Le total des acides comprend les acides en C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>. Les chiffres indiquent des valeurs relatives rapportées à l'échantillon de référence « Aromatique A ». Tous les échantillons aromatiques ou non sont des tabacs flue-cured. L'échantillon d'Orient est du Samsun.

<sup>b</sup>  $\frac{i-C_5}{n-C_5} = \frac{\text{quantité relative d'acide isovalérique rapportée à celle de « Aromatique A »}}{\text{quantité relative d'acide n-valérique rapportée à celle de « Aromatique A »}}$

BMV = acide  $\beta$ -méthylvalérique

n-C<sub>6</sub> = acide n-caproïque.

TABLE 2

Correlation between organoleptic evaluation of leaf aroma and total steam-volatile neutrals and acids determined by gas chromatography.

Corrélation entre l'évaluation organoleptique de l'arôme de la feuille et les fractions totales neutres et acides, entraînables à la vapeur déterminées par chromatographie gazeuse.

Tobacco	RELATIVE RATINGS <sup>a</sup>		
	Leaf Aroma	Total Neutrals	Total Acids
Aromatic A . . . . .	1	1	1
Aromatic B . . . . .	3	3.4	3
Aromatic C . . . . .	2	2	2
Aroma-Deficient A . . . . .	4	3.4	4
Aroma-Deficient B . . . . .	5	5	5

<sup>a</sup> Degree of leaf aromaticity (determined by panel test) or level of total neutrals or acids. 1 = greatest aroma or highest level of neutrals or acids. 3.4 = the difference in the two samples was of questionable significance.

<sup>a</sup> Degré d'arôme de la feuille (déterminé par un jury de dégustateurs) ou niveau des fractions neutres et acides totales. 1 = arôme maximum ou niveau maximum des neutres et des acides. 3.4 = la différence entre les 2 échantillons n'était pas absolument significative.

is mostly air and excess nitrogen. The remainder of the continuous phase consists of carbon dioxide, carbon monoxide and large numbers of hydrocarbons, carbonyls, alcohols, and esters such as benzene, toluene, methyl acetate, methyl formate, isobutyraldehyde, isovaleraldehyde and diacetyl. Many of these compounds in the continuous phase have distinct organoleptic properties and might be expected to influence smoke aroma and flavor.

Just as in the case of leaf, group determinations on smoke allow some prediction of the smoke flavor, e.g. total alkaloids and total volatile bases (5). Also, some information is available on the contribution of specific compounds to smoke flavor. For example, GLOCK and co-workers (14) have shown that tobaccos containing high levels of nicotine give rise to a smoke which has large amounts of myosmine and other pyridine bases and has an undesirable taste and aroma in panel tests. Generally, however, large gaps exist in our knowledge of smoke flavor-chemical composition relationships. Among the volatile neutral components of smoke, the carbonyls have been studied intensively by workers interested in flavour and aroma, and significant contributions have been made by GROB (15, 16), BUYSKE et al. (17), IRBY and HARLOW (18), MOLD and McRAE (19), TOUEY (20) and others. In general, the major carbonyls are acetaldehyde, acetone, methyl ethyl ketone, furfural and n-butyraldehyde. It is generally believed that the volatile carbonyls are found in the vapor phase although some workers have obtained higher values for carbonyls from whole smoke condensate compared to the vapor phase of smoke. The levels of carbonyls in smoke are related to the moisture content of the cigarettes, the lower the moisture, the higher the carbonyl contents (21). Although « dry » cigarettes are known to be more irritating than « moist », no experimental relationship between irritation and carbonyl content has been claimed (21).

Our laboratory has recently studied the entire steam-volatile neutral fraction of smoke condensates of blended and unblended cigarettes by gas chromatography (22). At least 66 peaks were present compared to about 15-20 for the corresponding fraction of leaf, showing that a large number of neutral substances are formed during

consiste en des substances non condensables à  $-190^{\circ}$  C et est composée pour la plus grande partie d'air et d'azote en excès. Le reste de la phase continue consiste en  $\text{CO}_2$ , CO et un grand nombre d'hydrocarbures, carbonyles, alcools, éthers tels que benzène, acétate de méthyle, formate de méthyle, aldéhyde isobutyrique, aldéhyde isovalérique et diacétyle. Un grand nombre de ces composés dans la phase continue ont des propriétés organoleptiques distinctes, et l'on peut penser qu'elles ont une influence sur l'arôme et la vapeur de la fumée.

Tout comme c'est le cas pour la feuille, les déterminations de groupes, en ce qui concerne la fumée, permettent de présumer dans une certaine mesure de la saveur de la fumée, par exemple les alcaloïdes totaux et les bases volatiles totales (15). De même on peut obtenir quelque information sur la contribution des composés spécifiques à la saveur de la fumée. Ainsi, par exemple, GLOCK et ses collaborateurs (14) ont montré que des tabacs ayant une teneur élevée en nicotine donnent une fumée qui contient de grandes quantités de myosmine et autres bases pyridines, et a un goût et un arôme désagréables relevés dans les épreuves de dégustation. Cependant, d'une façon générale, il y a de grandes lacunes dans notre connaissance des relations existant entre saveur de la fumée et composition chimique. Parmi les composés neutres volatils de la fumée les carbonyles ont été étudiés d'une manière approfondie par des chercheurs intéressés par la saveur et l'arôme, et des travaux importants ont été faits par GROB (15-16), BUYSKE et ses élèves (17), IRBY et HARLOW (18), MOLD et McRAE (19), TOUEY (20) et d'autres. En général, les principaux carbonyles sont l'acétaldéhyde, l'acétone, le méthyl-éthyl-cétone, le furfural et la n-aldéhyde butyrique. On est d'avis en général, que les carbonyles volatils sont trouvés dans la phase vapeur, bien que quelques chercheurs aient obtenu pour des carbonyles des valeurs plus élevées avec des condensats de fumée, par comparaison avec la phase vapeur de la fumée. La teneur de la fumée en carbonyles est en rapport avec le degré d'humidité des cigarettes : plus l'humidité est faible et plus la teneur en carbonyles est élevée (21). Bien que les cigarettes « sèches » soient connues pour être plus irritantes que les « fraîches », on n'a pas affirmé qu'il existait un rapport vérifié expérimentalement entre irritation et teneur en carbonyles.

Notre laboratoire a étudié récemment par la chromatographie en phase gazeuse (22) la fraction neutre entière entraînable à la vapeur, des condensats de fumée de cigarettes en tabacs mélangés et non-mélangés. On a découvert la présence de 66 pics au moins, comparés à environ 15-20 pour la fraction correspondante de la feuille, ce qui montre

the burning process. Undoubtedly, many of the peaks contained more than one compound. Five peaks identified in the neutral fraction of leaf, i.e. furfural, furfuryl alcohol, *m*-tolualdehyde, benzyl acetate and neophytadiene, were also present in the smoke. Also, evidence was obtained for the presence of the C<sub>3</sub> to C<sub>10</sub> *n*-aldehydes,  $\beta$ -pinene, 5-methylfurfural and  $\beta$ -phenethyl acetate in this fraction.

The volatile neutrals from unblended and blended bright, burley, Maryland and Turkish cigarettes showed only quantitative differences. Among unblended types, smoke from bright cigarettes contained more of most of the peaks than burley, Maryland and Turkish smoke. The descending order of total neutrals was bright, Turkish, burley and Maryland as shown in Table 3. The values are relative amounts using the smoke from unblended bright tobacco as a reference. Data are also shown here for two blends. One blend contained 60% bright, 35% burley, and 5% Maryland; the other blend was the same except for having 20% of the bright replaced by Turkish.

On blending the four tobacco types, an interesting effect was noted. By knowing the relative amounts of a given peak in the smoke of unblended bright, burley, Maryland and Turkish tobaccos and the percentage composition of these tobaccos in a blend, one may attempt to calculate the amount of each peak expected in smoke from blends of these tobaccos. Of course, such calculation is based on the assumption that the tobaccos contribute their components additively to the blend. On comparing such calculated values with the observed values for the volatile neutrals it was noted that an antagonistic effect occurred with most peaks. This is apparent in Table 3 which shows the amounts of total volatile neutrals in the blends to be less than the amounts in the two major components of the blends, bright and burley.

Table 4 presents other data on this point. More than thirty chromatographic peaks in the neutral fraction were arbitrarily designated « major peaks » and the calculated values for an additive effect were compared with the observed values for these peaks. With both blends, five or six peaks gave observed values which were 25-50% higher than calculated, indicating a synergistic effect on blending. The remainder showed an antagonistic effect, being on the average 46% lower than expected. Minor

qu'un grand nombre de substances neutres sont formées au cours de la combustion. Sans doute possible, un grand nombre de pics contenaient plus d'un composé. Cinq pics identifiés dans la série neutre de la feuille, c'est-à-dire le furfurole, l'alcool furfurylique, le *m*-tolualdéhyde, l'acétate de benzyle et le néophytadiène étaient également présents dans la fumée. De même, on a eu la certitude de la présence de *n*-aldéhydes C<sub>3</sub> à C<sub>10</sub>, du  $\beta$ -pinène, du 5-méthylfurfurole et de l'acétate de  $\beta$ -phénylétyle dans cette fraction.

Les neutrals volatils de cigarettes non-mélangées et mélangées de flue-cured, de burley, de maryland et d'Orient n'ont montré que des différences quantitatives. Parmi les types non-mélangés, la fumée de cigarettes de flue-cured contenait plus de la majorité des pics que la fumée du burley, du maryland et de l'Orient. L'ordre descendant, pour les neutrals totaux a été le flue-cured, l'Orient et le maryland, ainsi que l'indique le tableau 3. Les valeurs sont des quantités relatives, pour lesquelles la fumée provenant de tabac flue-cured non mélangé a été prise comme référence. On donne ici également les chiffres pour deux mélanges. L'un des mélanges contenait 60% de flue-cured, 35% de burley et 5% de maryland; l'autre mélange était le même sauf que 20% du flue-cured y étaient remplacés par de l'Orient.

En mélangeant les quatre types de tabac, on a noté une conséquence intéressante. Connaissant les quantités relatives d'un pic donné dans la fumée de tabac flue-cured, burley, maryland et d'Orient non mélangés et le pourcentage de ces tabacs dans la composition d'un mélange, on peut essayer de calculer l'importance de chaque pic qu'on s'attend à trouver dans la fumée des mélanges de ces tabacs. Naturellement un calcul de ce genre est basé sur la supposition que les tabacs contribuent au mélange en s'additionnant. En comparant les valeurs ainsi calculées avec les valeurs observées pour les neutrals volatils, on a noté qu'un effet antagoniste se produisait pour la plupart des pics. Ceci apparaît dans le tableau 3 qui montre que les quantités de neutrals totaux volatils dans les mélanges sont moindres que les quantités dans les deux composants principaux des mélanges, le flue-cured et le burley.

Le tableau 4 présente d'autres données sur ce point. Plus de trente pics chromatographiques dans la fraction neutre ont été arbitrairement désignés comme « pics principaux », et les valeurs calculées pour un effet additif ont été comparées avec les valeurs observées pour ces pics. Pour les deux mélanges, cinq ou six pics ont donné des valeurs observées qui ont été de 25 à 50% plus élevées que celles qui avaient été calculées, ce qui indique un effet synergique sur le mélange. Le reste présente un effet

TABLE 3

Total, steam-volatile neutrals and acids and differences in certain isomeric distributions of acids in smoke of blended and unblended cigarettes.

Fractions neutres et acides totales, entraîna- bles à la vapeur et différence dans cer- taines répartitions des isomères des acides dans la fumée de cigarettes de tabac mé- langés ou non.

Type <sup>a</sup>	Total Neutrals	Total Acids <sup>b</sup>	Isomeric Distributions <sup>c</sup>	
			$\frac{i-C_5}{n-C_5}$	$\frac{BMV}{n-C_6}$
Bright . . . . .	1.0	1.0	1.0	1.0
Burley . . . . .	.59	.54	2.2	1.2
Maryland . . . . .	.50	.77		
Turkish . . . . .	.72	1.6	3.6	9.0
Blend without Turkish . . . . .	.54	.70	1.3	.93
Blend with Turkish . . . . .	.57	1.3	2.4	3.2

<sup>a</sup> See text for blend compositions

<sup>b</sup> C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub> acids only.

<sup>c</sup> See table 1 for designations.

<sup>a</sup> La composition des mélanges figure dans le texte.

<sup>b</sup> acides C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub> seulement.

<sup>c</sup> voir la note b du tableau 1.

TABLE 4

Synergistic or suppressive effect on forma- tion of smoke neutrals and acids by blend- ing tobaccos.

Effet synergique ou suppressif des mélanges de tabacs sur la formation des neutres et acides de la fumée.

Blend	Group	Synergism <sup>a</sup>		Suppression <sup>a</sup>	
		No. Cmpds.	Aver. %	No. Cmpds.	Aver. %
Blend without Turkish . . . . .	Neutrals	5	+ 25	27	- 46
Blend without Turkish . . . . .	Acids	0		7	- 21
Blend with Turkish . . . . .	Neutrals	6	+ 51	25	- 46
Blend with Turkish . . . . .	Acids	7	+ 41	0	

<sup>a</sup> The number of gas chromatographic peaks or compounds (No. Cmpds.) which are present in larger or smaller amounts than expected based on blend composition. The average percentages (Aver. %) higher or lower than expected are also given for the indicated compounds. See text for blend compositions.

<sup>a</sup> Le nombre des pics chromatographiques ou composés (No. Cmpds) qui sont présents en quantités supérieures ou inférieures à celles prévues d'après la composition du mélange. Les pourcentages moyens (Aver. %), supérieurs ou inférieurs à ceux prévus sont aussi donnés pour les composés indiqués. La composition des mélanges figure dans le texte.

peaks in the blends gave this same general pattern. A check of other publications comparing blended and unblended cigarette smoke showed that BUYSKE et al. (17) have recorded a similar effect with some carbonyls although the authors did not emphasize this point. Perhaps this alteration of an additive effect by blending is not unexpected. The individual tobaccos therein possess greatly different burn rates and have distinctly different patterns of weight loss on heating, as shown recently by PHILIPPE and co-workers (23).

Significant amounts of steam-volatile acidic material are found in cigarette smoke. The major components of the strongly and weakly acidic fractions thereof are the lower fatty acids and simple phenols, respectively. Perhaps the most definitive work on the volatile strong acids of smoke has been done by BUYSKE et al. (24), who developed an excellent analytical method for these compounds. Unfortunately, the method does not separate isomers of acids in the C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub> range which, in the leaf, have distinctive patterns of distribution in the different tobacco types. Our laboratory has investigated these acids in smoke (25) by a gas chromatographic method which separates such isomers (11). Chromatograms of the entire volatile acidic fraction of cigarette smoke showed the presence of most of the acids found in leaf as well as significant amounts of common smoke phenols, such as phenol and isomeric cresols and xlenols. Except for the phenols, the chromatograms were quite similar to these from leaf, showing that large numbers of compounds not present in the leaf are not generated in the smoke as in the case of the neutrals.

The smoke condensates from blended and unblended cigarettes showed only quantitative differences, certain features of which are given in Table 3. The data are given in terms of relative amounts of acids or proportions of isomers based on bright as a reference. Not included here are values for formic, acetic and propionic acids, which comprise the major group of volatile acids in smoke. BUYSKE et al. (24) have given accurate values for these acids in the smoke of the major tobacco types.

Turkish tobacco smoke contains more of the C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub> acids than the other types and much more of the branched-chain C<sub>5</sub> and C<sub>6</sub> isomers than bright. This parallels the findings in leaf. In fact, the great pre-

antagoniste, étant en moyenne 46 % au-dessous de ce qu'on attendait. Des pics mineurs, dans les mélanges, ont présenté la même particularité. L'examen d'autres travaux qui comparent la fumée de cigarettes mélangées et non-mélangées a montré que BUYSKE et ses élèves (17) ont relevé un effet semblable pour quelques carbonyles, bien que les auteurs n'aient pas souligné ce point. Peut-être cette altération d'un effet additif par le mélange n'est-elle pas inattendue. Les différents tabacs ont des taux de combustion fortement différents et il en va de même pour les pertes dues à la chaleur, ainsi que l'ont montré récemment PHILIPPE et ses collaborateurs (23).

On trouve des quantités importantes de substances acides entraînaibles à la vapeur dans la fumée de cigarette. Les principaux composants des fractions fortement et faiblement acides de celle-ci sont respectivement les acides gras les moins chargés en carbone et les phénols simples. Peut-être le travail le plus complet sur les acides forts volatils de la fumée est-il dû à BUYSKE et ses élèves (24), qui ont développé une excellente méthode analytique pour ces composés. Malheureusement cette méthode ne sépare pas les isomères des acides dans la série C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>, qui, dans la feuille sont distribués d'une manière qui diffère suivant le type de tabac. Notre laboratoire a étudié ces acides dans la fumée (25) par une méthode de chromatographie en phase gazeuse, qui sépare ces isomères (11). Des chromatogrammes de la fraction entière acide volatile de la fumée de cigarette ont montré la présence de la plupart des acides trouvés dans la feuille ainsi que de quantités importantes de phénols communs de la fumée tels que le phénol et les crésols et xylénols isomériques. Sauf pour les phénols, les chromatogrammes ont été tout à fait semblables à ceux de la feuille et ils ont montré qu'un grand nombre de composés qui ne se trouvent pas dans la feuille ne sont pas produits dans la fumée, comme c'est le cas pour les neutres.

Les condensats de fumée de cigarettes mélangées et non-mélangées n'ont montré que des différences quantitatives, dont certaines particularités figurent au tableau 3. Les nombres représentent des quantités relatives d'acides ou des proportions d'isomères, la base de référence étant le flue-cured. Ne sont pas comprises les valeurs relatives aux acides formique, acétique et propionique, qui comprennent le groupe principal des acides volatils de la fumée. BUYSKE et ses élèves (24) ont donné des valeurs exactes pour ces acides contenus dans la fumée des principaux types de tabac.

La fumée des tabacs d'Orient contient plus d'acides C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub> que les autres types et beaucoup plus d'isomères en C<sub>5</sub> et C<sub>6</sub> de la chaîne ramifiée que le flue-cured. Il y a un parallélisme avec ce que l'on a observé pour la

ponderance of  $\beta$ -methylvaleric acid in the intermediate acid range is the chief characteristic of both Turkish tobacco smoke and leaf. The strong influence of Turkish tobacco in the blended cigarettes is apparent. In comparing the ratios of branched chained  $C_5$  and  $C_6$  acids in the two blends, the contribution of isovaleric and  $\beta$ -methylvaleric acids from Turkish tobacco is easily seen.

Table 4 summarizes other data on the effect of blending the four tobacco types. Although blending resulted in suppression of most neutral smoke components, a different pattern was observed with the volatile acids. Seven acids in the  $C_4$ - $C_7$  range gave amounts higher than expected in the blend with Turkish tobacco. The synergism amounted to an average of 41% greater than an additive effect. However the blend without Turkish gave an opposite effect, showing about 20% less of the acids than expected. One may postulate that a pH effect contributed to this difference since the tobacco types are known to differ markedly in pH. However, the pH of the two blends were shown to be identical and another explanation of these findings must be found.

Next, we were interested in a possible correlation between smoke flavor and the volatile neutrals or acids in the smoke from the five aromatic grades of bright tobacco previously discussed. As noted above, a correlation was found for leaf aroma in these samples. The analytical results for the smoke acids and a comparison with leaf acids are shown in Table 5. With one exception, there was a similar pattern of relative amounts of acids in leaf and smoke; however, the levels of smoke acids were approximately 30 times as large as the leaf acids, indicating that free volatile acids are released or formed during burning. The exception in the similarity of patterns of smoke and leaf acids was Aroma-Deficient B, which was entirely out of line in smoke acids. This exception extended, of course, to the correlation between smoke flavor and smoke acids, which is shown in Table 6. Aroma-Deficient B was the least flavorful cigarette but contained the second highest level of volatile smoke acids; all other samples showed a trend toward a correlation, but not to the extent encountered with leaf aroma.

feuille. En fait la grande prépondérance d'acide  $\beta$ -méthylvalérique dans la série acide intermédiaire est la caractéristique principale à la fois de la fumée et de la feuille du tabac d'Orient. La forte influence du tabac d'Orient dans les cigarettes de mélanges est apparente. En comparant les proportions d'acides en  $C_5$  et  $C_6$  à chaîne ramifiée dans les deux mélanges, on voit aisément l'apport en acides isovalérique et  $\beta$ -méthylvalérique du tabac d'Orient.

Le tableau 4 résume d'autres données sur l'effet du mélange des quatre types de tabac. Bien que le mélange ait eu pour résultat de supprimer la plupart des composants neutres de la fumée, un état de choses différent a été constaté pour les acides volatils. Sept acides de la série  $C_4$ - $C_7$  ont donné des quantités plus grandes que ce qu'on attendait dans le mélange avec le tabac d'Orient. Le synergisme a atteint un degré en moyenne 41% plus élevé qu'un effet additif. Cependant le mélange sans Orient a donné un effet opposé, montrant environ 20% en moins d'acides que prévu. On peut poser en principe qu'un effet de pH a contribué à cette différence, dès lors que l'on sait que les types de tabac ont entre eux des différences de pH prononcées. Toutefois il est apparu que le pH des deux mélanges était identique, et il faut donc trouver une autre explication à ces constatations.

Nous nous sommes occupés ensuite d'une corrélation possible entre la saveur de la fumée et les substances volatiles neutres ou acides de la fumée provenant des cinq grades aromatiques du tabac flue-cured étudiés précédemment. Ainsi qu'il a été dit plus haut, une corrélation pour l'arôme de la feuille a été trouvée dans ces échantillons. Le tableau 5 montre les résultats de l'analyse en ce qui concerne les acides de la fumée ainsi qu'une comparaison avec les acides de la feuille. A une exception près, la quantité relative d'acides dans la feuille et dans la fumée a été du même modèle pour tous; toutefois la teneur de la fumée en acides a été approximativement trente fois plus élevée que celle de la feuille, ce qui indique que des acides volatils libres sont libérés ou formés au cours de la combustion. L'exception, dans la similitude de la présence des acides dans la feuille et la fumée, a été le « sans-arôme B » qui divergeait absolument en ce qui concerne les acides de la fumée. Cette exception naturellement s'est étendue à la corrélation entre la saveur et les acides de la fumée qui apparaît dans le tableau 6. Le « sans-arôme B » était la cigarette la plus pauvre en saveur, mais était la seconde du point de vue teneur en acides volatils de la fumée; tous les autres échantillons ont montré une tendance à la corrélation, mais pas dans la mesure constatée pour l'arôme de la feuille.

TABLE 5

Relative amounts of acids in bright leaves of varying aromaticities and in the smoke thereof.

Teneurs relatives en acides des feuilles de tabac flue-cured de diverses aromaticités et de leur fumée.

Tobacco	Relative Amounts of Acids	
	Leaf	Smoke
Aromatic A .....	1.0	1.0
Aromatic B .....	.84	.69
Aromatic C .....	.95	.82
Aroma-Deficient A .....	.77	.66
Aroma-Deficient B .....	.71	.90

TABLE 6

Comparison of relative smoke flavour and steam-volatile strong acids and neutrals in smoke.

Comparaison des saveurs relatives de la fumée et de ses teneurs en acides forts et neutres, entraînés à la vapeur.

Cigarette	RELATIVE RATINGS <sup>a</sup>			
	Smoke Flavour	Total Acids	Total Neutrals	Selected Neutrals
Aromatic A .....	1-2	1	4	1
Aromatic B .....	3	4	2	3
Aromatic C .....	1-2	3	3	2
Aroma-Deficient A .....	4	5	5	5
Aroma-Deficient B .....	5	2	1	4

<sup>a</sup> 1 = highest smoke flavour or largest amount of indicated components.

1-2 = equal in flavour. « Selected Neutrals » refers to certain high boiling components discussed in text. Cigarettes were made of bright tobaccos shown in Table 2.

<sup>a</sup> 1 = saveur maximum de la fumée ou teneur maximum en composés indiqués.

1-2 = égalité de saveur. « Selected neutrals » se rapporte à certains composants à point d'ébullition élevé dont il est question dans le texte. Les cigarettes étaient faites de tabacs flue-cured figurant au tableau 2.

*It is well known that smoke flavor is influenced by a « proper balance » of volatile acidic and basic constituents in the smoke. Whether or not this is true for leaf aroma is another question, since the level of free volatile bases in leaf is very low presumably due to the relatively low pH. Analysis of Aroma-Deficient B showed a high level of reducing sugars and very low level of total volatile bases, which might have resulted in a flavor-deficient smoke regardless of acid levels. However, the abnormally high sugar level was not responsible for the higher levels of acids therein, as shown by a failure to raise the level of smoke acids by adding glucose to cigarettes, thus confirming the earlier work by QUIN et al. (26). Work is now underway to determine the volatile bases in these smoke condensates and relate this information to the correlation problem.*

*The total steam-volatile neutrals in the aromatic grades of bright cigarettes showed a similar lack of conclusive correlation with smoke flavor, as shown in Table 6. However, when the evaluation was limited to certain high boiling components, some correlation could be demonstrated. These components elute slow from polar columns and show similar chromatographic behavior to the neutral substances of leaf for which some correlation with leaf aroma was obtained. Work on this problem is still underway.*

*In evaluating the above data on quality-composition relationships one must recognize many potential sources of error or variability not discussed herein, e.g. shortcomings of the analytical methods (9, 11, 22), the subjectivity of panel testing, the great variability of tobacco and the limited number of samples tested. In their proper perspective, the data represent a preliminary survey of chemical differences in tobacco designed to stimulate and perhaps direct more intensive investigation which will better determine the applicability of the quality-composition relationships.*

*Acknowledgements : Sincere appreciation is extended to Drs. BURDICK and SCHMELTZ and Messrs. CHAMBERLAIN, CHRZANOWSKI, DREYFUSS and MILLER of this Division, who shared in this work and to Mr. J.M. MOSELEY, American Tobacco Company, who provided the cigarettes and tobaccos and made available the panel test results and other valuable data.*

il est bien connu que la saveur de la fumée est influencée par un « équilibre convenable » des composants volatils acides et basiques de la fumée. Quant à savoir s'il en va de même pour l'arôme de la feuille, c'est une autre question, étant donné que la teneur de la feuille en bases volatiles libres est très faible, ce qui est probablement dû au niveau relativement bas du pH. L'analyse du « sans-arôme B » a montré une haute teneur en sucres réducteurs et une teneur très faible en bases totales volatiles, ce qui a pu avoir pour conséquence une fumée sans saveur, la teneur en acides ne jouant aucun rôle. Toutefois la teneur en sucre, anormalement élevée, n'a pas été la cause des teneurs plus élevées en acides puisqu'il est apparu que l'on augmente pas la teneur de la fumée en acides en ajoutant du glucose aux cigarettes, ce qui confirme les travaux antérieurs de QUIN et de ses élèves (26). Des études sont en cours actuellement en vue de déterminer les bases volatiles dans ces condensats de fumée et de relier cette information au problème de la corrélation.

Les neutres totaux entraînés à la vapeur dans les grades aromatiques des cigarettes de tabac flue-cured ont montré une absence similaire de corrélation concluante avec la saveur de la fumée, comme l'indique le tableau 6. Toutefois, lorsque l'évaluation a été limitée à certains composés à point d'ébullition élevé, on a pu constater une certaine corrélation. Ces composés sont élués lentement dans les colonnes polaires et montrent le même comportement chromatographique envers les substances neutres de la feuille pour lesquelles on a obtenu une certaine corrélation avec l'arôme de la feuille. Les travaux sur cette question continuent.

Évaluant les données qui précèdent sur la relation qualité-composition, il faut reconnaître de nombreuses sources possibles d'erreur ou de variabilité, auxquelles on ne s'est pas arrêté ici, par exemple des insuffisances des méthodes analytiques (9, 11, 22), le caractère subjectif des épreuves de dégustation, la grande variabilité du tabac, et le nombre limité des échantillons soumis à expériences. Dans leur propre perspective, les données représentent une vue d'ensemble préliminaire sur les différences de nature chimique dans les tabacs, conçue pour stimuler et peut-être guider des recherches plus poussées, qui détermineront mieux ce qu'il y a d'applicable dans la connaissance de la relation entre qualité et composition.

Remerciements sincères aux Directeurs BURDICK et SCHMELTZ et à Messieurs CHAMBERLAIN, CHRZANOWSKI, DREYFUSS et MILLER, de cette Division, qui ont pris part à ce travail, ainsi qu'à Monsieur J.M. MOSELEY, American Tobacco Company, qui a fourni les cigarettes et le tabac et nous a communiqué le résultat des épreuves de l'expertise de dégustation et d'autres données précieuses.

## LITERATURE

1. JOHNSTONE R.A.W., PLIMMER J.R., Chem. Revs. 59 : 885 (1959).
2. Tobacco Mfrs. Standing Committee Research Papers, No. 3, Supp. 1, 2, « The Constituents of Tobacco Smoke : An Annotated Bibliography », edited by H.R. BENTLEY and E.G.N. BERRY, London, 1959, 1960, 1963.
3. BACOT A.M., U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. No. 1225 (1960).
4. PHILLIPS M., BACOT A.M., U.S. Dept. Agr. Tech. Bull. No. 1186 (1958).
5. BRADFORD J.A., HARLOW E.S., HARLAN W.R., HANMER H.R., Ind. Eng. Chem. 29 : 45 (1937).
6. ONISHI I., et al., Bull. Agr. Chem. Soc. Japan 19 : 137 (1955),  
19 : 143 (1955), 19 : 148 (1955), 20 : 61 (1956), 20 : 68 (1956),  
20 : 70 (1956), 21 : 38 (1957), 21 : 43 (1957), 21 : 82 (1957),  
21 : 86 (1957), 21 : 90 (1957), 21 : 95 (1957), 21 : 177 (1957),  
21 : 181 (1957), 21 : 239 (1957), 22 : 17 (1958).
7. WEYBREW J.A., STEPHENS R.L., Tobacco Science 6 : 53 (1962).
8. SHAW W.G.J., STEPHENS R.L., WEYBREW J.A., Ibid 4 : 179 (1960).
9. BURDICK D., SCHMELTZ I., MILLER R.L., STEDMAN R.L., Ibid 7 : 97 (May 24, 1963).
10. SCHMELTZ I., MILLER R.L., STEDMAN R.L., J. Gas Chromatog. 1 (8) : 27 (1963).
11. SCHMELTZ I., STEDMAN R.L., MILLER R.L., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 46 : 779 (1963).
12. OSBORNE J.S., ADAMEK S., HOBBS M.E., Anal. Chem. 28 : 211 (1956).
13. PHILIPPE R.J., HOBBS M.E., Ibid 28 : 2002 (1956).
14. GLOCK E., WRIGHT M.P., Abstracts 16th Tobacco Chem. Res. Conf., Sept. 1962, Richmond, Va., p. 13.
15. GROB K., Beitr. Tabakforsch. (7) : 285 (1962).
16. GROB K., Ibid (9) : 315 (1962).
17. BUYSKE D.A., OWEN L.H., WILDER P. Jr., HOBBS M.E., Anal. Chem. 28 : 910 (1956).
18. IRBY R.M. Jr., HARLOW E.S., Tobacco Science 3 : 52 (1959).
19. MOLD J.D., McRAE M.T., Ibid 1 : 40 (1957).
20. TOUEY G.P., Ibid 1 : 78 (1957).
21. PAILER M., KUHN H., GRÜNBERGER I., Fachliche Mitt. Oesterr. Tabakregie (3), 33 (1962).
22. BURDICK D., STEDMAN R.L., Tobacco Science 7 : 113 (June 28, 1963).
23. PHILIPPE R.J., MOORE H., MAZZONE P.V., Ibid 7 : 21 (Feb. 15, 1963).
24. BUYSKE D.A., WILDER P. Jr., HOBBS M.E., Anal. Chem. 29 : 105 (1957).
25. STEDMAN R.L., BURDICK D., SCHMELTZ I., Tobacco Science, 7 : 166 (Nov. 1, 1963).
26. QUIN L.D., GEORGE W., MENEFEE B.S., J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 44 : 367 (1961).